

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-216460

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)8月29日

G 01 N 33/53
33/577

W 7906-2G
B 7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 変性リボ蛋白検出用キット

⑮ 特 願 平1-231893

⑯ 出 願 平1(1989)9月6日

優先権主張 ⑰ 昭63(1988)9月29日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭63-244987

⑳ 発 明 者	足 立 正 一	群馬県高崎市石原町3493番地の9
㉑ 発 明 者	斉 藤 俊 光	群馬県群馬郡群馬町大字棟高1928-340番地
㉒ 発 明 者	大 谷 紀 美 代	埼玉県児玉郡神川町大字渡瀬821-3番地
㉓ 発 明 者	田 村 亜 紀	群馬県前橋市大利根町2丁目9-6
㉔ 出 願 人	株式会社日本抗体研究 所	群馬県高崎市栄町17番5号
㉕ 代 理 人	弁理士 三 枝 英 二	外2名

明 細 書

発明の名称 変性リボ蛋白検出用キット

特許請求の範囲

① アポ蛋白A-Iに対するモノクローナル抗体を結合させたアフィニティゲルとアポ蛋白B-100に対するモノクローナル抗体を結合させたアフィニティゲルとの混合物を必須成分として含有することを特徴とする変性リボ蛋白検出用キット。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は変性リボ蛋白の検出用キット、より詳しくは特に心筋硬塞等の心疾患や、糖尿病、脳卒中等の脳血管障害等の各種動脈硬化性疾患の発症因子としての脂質代謝異常の臨床検査乃至診断に有用な新しい検査用キットに関する。

従 来 の 技 術

脂質代謝異常とは、リボ蛋白の合成、分泌、異

化の過程で之等のいずれかが異常をきたす状態と定義でき、これは先天性リボ蛋白代謝異常と後天性リボ蛋白代謝異常とに分類される。

また、上記脂質代謝異常は、種々の疾患、例えば心筋硬塞等の心疾患、脳卒中等の脳血管障害等の各種動脈硬化性疾患等の発症の重大な因子(リスクファクター)とされており、之等疾患の進展、予後等に重大な影響を及ぼすことが知られており、該脂質代謝異常の検出は、各種の臨床検査乃至診断に極めて重要な成果をもたらす。

従来、上記脂質代謝異常の検出法としては、血液中の総コレステロール値をパラメーターとするものが最も一般的に定着している。この方法は、血液中の総コレステロール値を常法、例えば酵素法により測定し、該値が臨床的及び経験的に設定された域値(正常域)を逸脱する場合を脂質代謝異常として検出するものである。また近年、血液中のリボ蛋白、即ち脂質とアポ蛋白との結合物を

比重により分画し、このうち特に高比重のリポ蛋白(高密度リポ蛋白、HDL)のコレステロール値を測定し、このHDLコレステロール値そのもの又は該値に対する総コレステロール値から該値を引いた値、所謂動脈硬化指数を、脂質代謝異常の検出パラメーターとする方法も行なわれている。

しかしながら、現在までに蓄積された多くの免疫学的調査の結果及び臨床的知見によれば、之等従来の脂質代謝異常の検出方法は、実際の脂質代謝異常を必ずしも的確に反映するものではなく、殊に临床上その意義は低いことがしばしば指摘されている。即ち、上記従来法はいずれも総コレステロール値又はこれとHDLコレステロール値を測定するものであって、これらの測定値はいずれも脂質代謝異常とは必ずしも関連しない。特に総コレステロール値の高値は虚血性心疾患のリスクファクターの一つとしての意義は有する(例えば

Med. Clin. North Am., 58, 363-379 (1974)参照)が、疾患と直接結びつくものではなく、その検出方法による脂質代謝正常群における疾患の発生や高度脂質代謝異常群における恒常的な健全性等は、いずれも何ら希なものではない。またHDLコレステロール値及びこれを基準とする動脈硬化指数をパラメーターとする場合も、上記と同様に実際の脂質代謝異常を必ずしも的確に反映するものではない(動脈硬化、14(4), 931-936 (1986)等参照)。

更に、最近の知見によると実際の脂質代謝異常には、超低比重リポ蛋白(VLDL)等のリポ蛋白が生体内で何らかの作用を受けることにより生成すると考えられる変性リポ蛋白が、重大な影響を及ぼすという報告が種々なされている(例えば Hui, D. Y., Innerarity, T. L., & Mahley, R. W., J. Biol. Chem., 259, 860-869 (1984); Gonen B et al., Diabetes, 30, 875 (1981)等参

照)。

従って、この変性リポ蛋白を検出できれば、脂質代謝異常を正確に検出でき、これは該脂質代謝異常をもたらす各種疾患の的確な診断手段として、殊に疾患の発見、進展状態、治療効果の把握等の臨床分野において非常に有効であると考えられるが、上記変性リポ蛋白の実体は現在尚不明確で、その検出手段も現在知られていない。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、脂質代謝異常を正確に検出でき、該脂質代謝異常をもたらす各種疾患の発見、進展状態、治療効果の把握等を可能とする、临床上非常に有効な変性リポ蛋白の新しい検出手段、そのためのキットを提供することにある。

本発明者は、上記目的より鋭意研究を重ねた結果、総血漿リポ蛋白から、アポ蛋白A-Iを構成成分とするリポ蛋白(アポA-I含有リポ蛋白)及びアポ蛋白B-100を構成成分とするリポ蛋白

(アポB-100含有リポ蛋白)を除いたものが、上記変性リポ蛋白に相当することを認めると共に、予め調製された特定の抗体を含むアフィニティゲル混合物と被検血液とを接触させる時には上記アポ蛋白A-I含有リポ蛋白及びアポ蛋白B-100含有リポ蛋白が見事に系外に除去され、系の脂質測定によって所望の変性リポ蛋白量を容易且つ確実に測定、検出できることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

即ち、本発明はアポ蛋白A-Iに対するモノクローナル抗体を結合させたアフィニティゲルとアポ蛋白B-100に対するモノクローナル抗体を結合させたアフィニティゲルとの混合物を必須成分として含有することを特徴とする変性リポ蛋白検出用キットに係わる。

本発明キットは、変性リポ蛋白、即ち血液中総リポ蛋白からアポ蛋白A-I含有リポ蛋白及びア

ポ蛋白B-100含有リポ蛋白を除いたりポ蛋白を測定するためのものであり、本発明によれば、上記キットを利用して測定される変性リポ蛋白量をパラメーターとして、脂質代謝異常の検出及びこれによる各種疾患の臨床検査乃至診断を行ない得る。即ち、上記変性リポ蛋白は、脂質代謝が正常な場合は血液中には殆んど存在しないが、脂質代謝異常の程度に応じてその存在量が増加し、該異常を的確に反映するものであり、本発明キットの利用によればこの脂質代謝異常を正確に測定、検出できる。

以下、本発明キット及びその利用による変性リポ蛋白の検定乃至脂質代謝異常の検定法につき詳述する。

本発明キットを利用した検定法において、検体としては血液、特に空腹時の血清又は血漿が好ましく、之等は被検者より採血後、常法に従い調製できる。

せることができる。

本発明に用いるアフィニティゲルは、通常の方法で調製できる。つまり、抗アポ蛋白A-I抗体及び抗アポ蛋白B-100抗体のそれぞれをプロモシアン等で活性化させたアフィニティゲルにカップリングさせ、その後両者を混合し、適当な緩衝液にて平衡化する。ここで用いられる抗体としては、抗ヒトアポA-Iモノクローナル抗体及び抗体ヒトアポB-100モノクローナル抗体（いずれも株式会社日本抗体研究所製造）を代表例として例示できるが、特に之等に限定されるものではない。また用いられるアフィニティゲルの代表例としては、例えば予めプロモシアン等で活性化されたセファロース4B（ファルマシア社製）等を例示でき、カップリング反応は上記ゲルと蛋白とのカップリング反応に慣用される常法に従い、通常pH8～10の範囲でゲル1ml当たり約1～10mg（IgG）の抗体を用いて、室温（約20

血液中のリポ蛋白は、コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸等の脂質とアポ蛋白とが結合して存在しているのであるから、変性リポ蛋白としてはその総量、その脂質のいずれか又は全部、そのアポ蛋白の総量等をいずれも使い得、之等のコレステロール値は、例えば酵素法により測定できる。

本発明に係わるキットは、アポ蛋白A-Iに対するモノクローナル抗体（抗アポ蛋白A-I抗体）及びアポ蛋白B-100に対するモノクローナル抗体（抗アポ蛋白B-100抗体）を結合させたアフィニティゲルの混合物をそのまま又は振盪及び遠心分離が可能なチューブに調製しておくことが好ましく、また予め適当な緩衝液、例えば0.01Mトリス塩酸緩衝液（pH7.4）+0.15M NaCl等の緩衝液で上記ゲルを平衡化しておくのが好ましい。更に上記緩衝液には、例えばアジ化ナトリウム等の通常の保存剤を含ま

～25℃）下に2時間以内で実施できる。

本発明キットの必須成分とする上記ゲル混合物における抗アポ蛋白A-I抗体及び抗アポ蛋白B-100抗体の配合割合は、特に限定されるものではなく、適宜決定できるが、通常前者に対して後者を等重量以上、好ましくは約1～2倍重量の範囲から選択するのが望ましい。また得られるゲル混合物のpHは一般には約7～7.5の範囲に調整されるのが好適である。

かくして調整されるゲル混合物を必須成分とする本発明キットには、更に必要に応じてサッカロースやウシ血清蛋白等の安定化剤及び／又は保存剤を添加配合できる。この保存剤はキットの使用に際し実験値に悪影響を与えないものから選択され、例えば代表的には希釈したアジ化ナトリウム（sodium azide）等を使用できる。また本発明キットには水溶性もしくは水と混和し得るグリセリン、アルコール類、グリコール類、グリコールエ

ーテル類等を含むさせることもできる。

本発明キットを利用した変性リポ蛋白の検出の好ましい一実施態様によれば、まず本発明キットの必須成分とするアフィニティゲル混合物を振盪及び遠心可能な適当な容器乃至テストチューブに入れ、適当な緩衝液で平衡化させた後、該容器内に所定量の被検血清を加え、室温で静置又は振盪して反応させた後、比較的低速度（約800～1000rpm）で遠心分離し、得られる上清にコレステロール発色試薬を加えて所定時間インキュベートした後、該上清の脂質又はアポ蛋白を吸光度測定器により測定することによって、被検血清中の変性リポ蛋白量を測定することができる。この方法における被検血清の使用量は、通常本発明ゲル混合物重量の約1/8重量程度、好ましくは1/4～1/16重量程度とするのがよい。

発 明 の 効 果

本発明キットの利用によれば、変性リポ蛋白を

酵素法（Mercko Test CHO、関東化学社製、2 μ l/10 μ l血漿、37℃、10分間インキュベート）により測定（365nmでの吸光度測定）した。

- (2) 上記血漿20 μ lを試験管に加え、抗アポA-Iモノクローナル抗体及び抗アポB-100モノクローナル抗体をそれぞれ結合させたアフィニティゲル（ゲル1 μ l当り各抗体を蛋白量として10 μ gずつカップリング反応させたブロムシアン活性化セファロース-4B）を含有する反応液（各ゲルを等量の0.01Mトリス塩酸緩衝液（pH7.4）に混和して調製したもの、各抗体のそれぞれ80 μ lを含む）600 μ lを分注し、振盪を30分間行ない、その後15分間静置して上清200 μ lを分取した。

該上清にMercko Test CHO（関東化学社製）2 μ lを添加し、37℃で20分間インキュベート後、該血清中のコレステロール量を365nm

簡便に測定でき、これを脂質代謝異常のパラメーターとして該異常を容易且つ有効に検出できる。殊に、血液中的の変性リポ蛋白量は脂質代謝異常及びその程度を的確に反映するものであり、本発明キットを用いた脂質代謝異常の検出によれば、前記した各種疾患の発見、進展、治療効果の把握等、特に従来の検出法では把握できなかった心筋硬塞等の心疾患や肥満等の病態の把握を充分且つ有効に行ない得る。

実 施 例

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。

実施例 1

- (1) 患者より空腹時EDTA採血し、遠心分離（2500～3000rpm）して血漿を得た。
得られた各血漿について、トリグリセライド量を酵素法（TG-555、協和メディクス社製）により測定した。またコレステロール量を

での吸光度測定により求めた。

- (3) その結果、トリグリセライドがコレステロールに比べて高い相関を示しており、このことより、外因性脂質代謝異常の一つの指標であるカイロミクロンレムナント及び内因性脂質代謝異常の一つの指標である異常VLDL（ β -）あるいはIDLを反映する変性リポ蛋白の検出が行ない得ることが確認できた。
- (4) また、上記において複数の健常人を検体として、同様にして血漿コレステロール値及び変性リポ蛋白量を求めた。

その相関関係を、横軸に血漿コレステロール値（mg/dl）、縦軸に変性リポ蛋白量（mg/dl）を取り第1図に示す。

該図より、本発明キットの利用により、健常人の変性リポ蛋白量を、コレステロール値とは関連なく常に0付近に測定できることが判る。

- (5) 比較のため、本発明キットを用いた上記方法

に代えて以下の方法を実施した。この方法は抗アポA-Iモノクローナル抗体結合アフィニティゲルを充填したカラムと、抗アポB-100モノクローナル抗体結合アフィニティゲルを充填したカラムとを用いて、血漿中のアポ蛋白A-I含有リポ蛋白(吸着画分)とアポ蛋白B-100含有リポ蛋白(吸着画分)とのそれぞれのコレステロール値を求め、之等を加算した値を血漿総コレステロール値から差引くことによって、変性リポ蛋白のコレステロール値を求めるものであり、以下の通り行なわれた。

即ち、抗アポA-Iモノクローナル抗体結合アフィニティゲルを充填したミニカラムと、抗アポB-100モノクローナル抗体結合アフィニティゲルを充填したミニカラムとに、各々前記(4)と同一の複数の健常人からの血漿250 μ lを流して吸着させ、カラムを0.01M PBS緩衝液(pH7.2)20 μ lで洗浄後、

TCHO)及び変性リポ蛋白コレステロール値:LipoZ-CHO)を、前記(4)記載の本発明方法と対比して、下記第1表に示す。

第 1 表

被検者 健常人	TCHO		LipoZ-CHO	
	本発明	比較	本発明	比較(P)
1	169	159	0	-16 (-10)
2	119	133	0	11 (8)
3	169	188	0	28 (15)
4	166	157	0	13 (8)
5	159	140	0	8 (6)
6	146	219	0	2 (1)

上記第1表より、本発明のキットを利用する方法によれば、比較法に比べて、より正確に変性リポ蛋白量を測定でき、バラツキのないことが判ると共に、本発明の測定法は、それ自体容易且つ簡便であり、非常に優れたものであるこ

1M酢酸及び0.5M NaCl混液10 μ lで溶出させ、溶出液に1/2倍量の3.5Mトリス塩酸緩衝液を加え、その1 μ lにMercko Test CHO (関東化学社製)2 μ lを添加し、37℃で30分間インキュベートした後、コレステロール量を365nmでの吸光度測定により求めた。

次いで上記で求めた各コレステロール値を血漿総コレステロール値当たりの比として、下記式(I)に従うパラメーター(P)を算出した。

$$\text{パラメーター (\%)} = \left(1 - \frac{B+C}{A}\right) \times 100 \quad (I)$$

但し、Aは血漿総コレステロール値(mg/dl)を、Bは血漿から分離したアポ蛋白A-I含有リポ蛋白のコレステロール値(mg/dl)を、Cは血漿から分離したアポ蛋白B-100含有リポ蛋白のコレステロール値(mg/dl)をそれぞれ示す。

得られた結果(血漿総コレステロール値:

とが明らかである。

(6) 更に、上記(4)において健常人に代えて糖尿病患者、虚血性心疾患患者、脳血管障害患者のそれぞれ複数人(各5名)を検体として、同様にして本発明キットを利用して変性リポ蛋白コレステロール値(LipoZ-CHO、mg/dl)を求めると共に、総コレステロール値(TCHO)、トリグリセライド値(TG)、高密度リポ蛋白コレステロール値(HDL-C)をそれぞれ求めた。

即ち、上記(1)と同様にして調製した各患者の血漿20 μ lを試験管に加え、抗アポA-Iモノクローナル抗体及び抗アポB-100モノクローナル抗体をそれぞれ結合させたアフィニティゲル(ゲル1 μ l当り各抗体を蛋白量として10 μ gずつカップリング反応させたブロムシアソニルセファロース-4B)を含有する反応液(各ゲルを等量の0.15M NaCl含有0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に

混和して調製した、各抗体のそれぞれ160 μ lを含む)600 μ lを分注し、30分間振盪後、10分間静置して上清200 μ lを分取し、次に該上清にMercko Test CHO (関東化学社製)2 μ lを添加し、37℃で20分間インキュベート後、該上清中のLipo-Z-CHO量を吸光度測定により求めた。

結果を各患者毎に下記第2表に示す。

第 2 表

被検者	TCHO	TG	HDL-C	LipoZ-CHO
糖尿病				
1	333	202	45	6
2	241	202	43	14
3	167	247	51	5
4	192	527	40	36
5	189	179	36	8

その結果を下記第3表に示す。

第 3 表

高脂血症患者の型	患者数(例)	変性リポ蛋白量(平均 \pm S.D.)
IIa	31	2.1 \pm 3.9
IIb	53	20.3 \pm 25.0
IV	16	7.7 \pm 6.7

実施例 2

実施例1に従うトリグリセライド(TG)及び総コレステロール(TCHO)測定値が高値[$TG > 150$ 、 $TCHO > 250$]を示し、高脂血症を呈すると判断された患者につき、98日間に亘って毎日朝晩プロブコール500mg(250mg錠2錠)を投与し、その投与開始前(治療前)及び投与期間終了後に、それぞれ実施例1と同様にして、トリグリセライド値及び血漿コレステロール値を測定すると共に、実施例1に

第 2 表 (続き)

被検者	TCHO	TG	HDL-C	LipoZ-CHO
虚血性心疾患				
1	241	187	47	12
2	296	812	33	81
3	198	127	42	8
4	143	94	59	9
5	331	190	43	12
脳血管障害				
1	198	118	33	10
2	248	484	37	31
3	244	138	48	5
4	178	199	37	6
5	249	54	40	4

(7) 更にWHOが定めている高脂血症の型分類に従って分類された患者の血漿を用いて、変性リポ蛋白量を上記(1)と同様にして測定した。

示したと同一の本発明キットを利用して、変性リポ蛋白値を測定した。

その結果、トリグリセライド値は、治療前値425から治療後値389に変化した。また、血漿コレステロール値の変化は第2図(1)に、変性リポ蛋白値は第2図(2)に示す通りであった。

之等の図から、本発明によれば症状に対応する正確な変性リポ蛋白の測定が可能であり、疾患の診断が行ない得ることが判る。

図面の簡単な説明

第1図は本発明キットを利用した変性リポ蛋白の測定値と血漿コレステロール値との相関を調べた図であり、第2図(1)及び(2)は、高脂血症患者の血漿コレステロール値及び変性リポ蛋白値を治療前後に測定した結果を示す図である。

(以上)

代理人 弁理士 三 枝 英 二



